

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/065133 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01451

(22) Internationales Anmeldedatum:  
12. Februar 2002 (12.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 07 083.7 13. Februar 2001 (13.02.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **KIESEWETTER, Holger** [DE/DE]; Am Grünen Zipfel 1, 13465 Berlin (DE). **SALAMA, Abdulgabar** [IL/DE]; Lotoweg 6, 13467 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **LUDERSCHMIDT, Wolfgang**; Industriepark Höchst, Gebäude F 821, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: LIGANDS USED FOR DETECTING PRIONS

(54) Bezeichnung: LIGANDEN FÜR DEN NACHWEIS VON PRIONEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of specific ligand carriers for detecting prions. The invention further relates to substances that are capable of binding to prions and that are subsequently used to detect prions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von spezifischen Ligandenträgern zum Nachweis von Prionen. Weiterhin werden Substanzen offenbart, die für die Bindung und den nachfolgenden Nachweis von Prionen geeignet sind.



**WO 02/065133 A2**

## Liganden für den Nachweis von Prionen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung Liganden zum Nachweis von  
10 Prionen, insbesondere im Rahmen eines BSE-Schnelltests. Weiterhin werden  
Substanzen offenbart, die für die Bindung und den nachfolgenden Nachweis von  
Prionen geeignet sind.

Prionen sind normale zelluläre Proteine (PrPc), die vor allem auf der Oberfläche  
von Neuronen nachgewiesen werden. Durch die Umwandlung des normalen  
15 zellulären Proteins in seine abnorme Isoform (PrPsc) resultiert eine pathogene  
Form mit neuen Eigenschaften. Im Gegensatz zu der normalen Form ist die  
entstandene Form nicht wasserlöslich und kann durch Proteasen nicht abgebaut  
werden. Nach der sogenannten "Protein only"-Hypothese führt das  
Zusammentreffen von pathologischen und normalen Prionen dazu, dass das  
20 normale Molekül seine Konformation ändert und die pathologische Form  
annimmt. Dieser Prozeß führt zur Akkumulation dieser Proteine im Gehirn und  
schließlich zu Enzephalopathien, zu denen die Traberkrankheit (Scrapie) des  
Schafs, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die  
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen zählen.

25 Glykosaminoglycane (GAGS) sind lineare Heteropolysaccharide, die auf  
Zelloberflächen verankert und eine wesentliche Rolle bei der Zelladhäsion und  
Migration spielen. Möglicherweise werden Prionen auch über diese Moleküle  
intrazellulär eingeschleust.

Pentosan (Poly-b-Xylose-2,3-Disulfonat; Pentosanpolysulfat) ist ein  
30 polysulfatiertes Polyglykosid (Molekulargewicht 4.000 bis 12.000 Dalton). Dieses  
Molekül scheint die Akkumulation von Prionen zu inhibieren. Es wurde gezeigt,  
dass diese Substanz im Vergleich zu anderen sulfatierten GAGS wie Heparin,  
Heparansulfat und Chondroitinsulfat am stärksten die Produktion von Prionen

inhibiert. Diese Inhibition ist möglicherweise auf eine direkte Verbindung mit den Prionen zurückzuführen [B. Caughey and G. Raymond, Journal of Virology, Feb. 1993, p. 643-650; B. Caughey et al., Journal of Virology, Apr. 1994, p.2135-2141; D. Sawitzky, Med. Microbiol Immunol. (1996) 184: 155-161; R. Gabizon et al., Journal of cellular Physiology 157: 319-325 (1993); Show-Ling Shyng et al., Journal of biological Chemistry, 1995 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; C. Farquhar et al., The Lancet, Vol. 353, January 9, 1999]

Es sind bereits PrP-spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper hergestellt worden, die beide Varianten PrPc und PrPsc erkennen. Mit Hilfe der verfügbaren monoklonalen Antikörper lassen sich beide Varianten indirekt unterscheiden und somit eine Erkrankung nachweisen.

Dies geschieht bisher durch Versetzung der Untersuchungsproben mit Proteinase K, die nur PrPc zerstört, nicht aber PrPsc. Mit Hilfe der Elektrophorese werden beide Proteine getrennt und die pathologische Form mit Antikörpern nachgewiesen. Obwohl die Sensitivität und Spezifität dieser Tests hoch ist, können nicht alle BSE-Fälle erkannt werden, da ein positives Ergebnis in diesen Tests von der Gesamtmenge der für die Untersuchung eingesetzten Prionen abhängig ist. Eine ausreichende hohe Gesamtmenge ist aber in aller Regel erst im Endstadium der Erkrankung im Gehirngewebe vorhanden, so daß entsprechende Untersuchungen bisher nur an Gewebe aus toten Lebewesen standardmäßig durchgeführt werden können [R. Meyer, Dt. Ärzteblatt 97, Heft 49, 08.12.2000, Seite A-3314]. Außerdem sind diese auf einer Elektrophorese beruhenden Tests langwierig und teuer.

Kürzlich ist es gelungen, mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln und einer speziellen Chromatografie die Erreger auch im Blut von Schafen und Elchen aufzuspüren und mit einem Westernblot-Test nachzuweisen [M. Schmerr et al., Journal of Chromatography A, 853 (1999) 207214]. Ein solcher Test ist allerdings extrem langwierig und teuer und in der Praxis als Routinetest kaum zu verwirklichen.

Von Adriano Aguzzi et al. wurde vor kurzem beschrieben, daß PrPsc spezifisch an Plasminogen binden. [M. B. Fischer et al., NATURE, Vol. 408, 23. November 2000] Ein auf dieser Bindung beruhender Test wurde nicht vorgestellt.

Spezifische Labormarker für diese Erkrankungen konnten bisher also nicht  
5 gefunden werden, und die Diagnose gelingt in der Regel erst nach dem Tod des Patienten oder nach dem Schlachten des Tieres. [S. B. Prusiner, PNAS USA, Vol. 95, pp. 13363-13383, Nov. 1998; A. L. Horwich and S. Weissman, Cell, Vol. 89, 499-510, May 1997]

In der DE 197 30 132 A1 und der WO 00/29850 werden *in-vitro*-Verfahren zum  
10 Nachweis von BSE-Erregern in einer Probe beschrieben, wobei jedoch der Nachweis im Gegensatz zu dem erfindungsgemäßen Verfahren direkt mit Hilfe von immobilisierten Antikörpern durchgeführt wird. Eine Verwendung von Glycosaminoglycan wird nicht beschrieben.

Bis zur vorliegenden Erfindung wurde noch kein Verfahren kommerziell  
15 verwirklicht, mit Hilfe dessen eine etwaige BSE-Erkrankung an lebenden Organismen nachzuweisen wäre. Gerade dies wäre aber angesichts der zur Zeit bestehenden Unheilbarkeit dieser Erkrankung und der nachgewiesenen Übertragbarkeit der Erkrankung von infizierten Tieren (z.B. Rindern), bei denen die Erkrankung jedoch noch nicht ausgebrochen sein muß, auf den Menschen über  
20 die aufgenommene Nahrung für die flächendeckende Prophylaxe und auch für die erfolgreiche Ausmerzungen der Erkrankung von überragender Bedeutung. Nicht unerwähnt bleiben sollen in diesem Zusammenhang auch die durch diese Erkrankung angerichteten volkswirtschaftlichen Schäden in Milliardenhöhe.

Trotz des sich aus dem vorstehend Genannten zwangsläufig ergebenden extrem  
25 hohen Bedarfs nach einem BSE-Test, der die genannten Nachteile überwindet, konnte ein solcher bis zu vorliegender Erfindung nicht zur Verfügung gestellt werden.

Angesichts des genannten Stands der Technik liegt der vorliegenden Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem  
30 BSE-Erreger (PrPsc) spezifisch nachgewiesen werden können. Dieses Verfahren

soll einfach und schnell in der Handhabung und sicher und kostengünstig in der Durchführung sein sowie einen extrem sensitiven Nachweis ermöglichen. Weiterhin soll das Verfahren *in-vitro* an Proben mit geringer PrPsc -Konzentration durchgeführt werden können, die z.B. aus lebenden Organismen gewonnen werden können.

Gelöst wird diese sowie weitere, nicht explizit genannte Aufgaben, die jedoch aus den hierin einleitend diskutierten Zusammenhängen ohne weiteres ableitbar oder erschließbar sind, durch ein Verfahren mit allen Merkmalen des Patentanspruchs 1. Zweckmäßige Abwandlungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüchen unter Schutz gestellt.

Dadurch daß man bei einem *in vitro*-Verfahren

- (i) eine Probe mit Proteinase K behandelt,
- (ii) die so behandelte Probe mit einem bindenden Prinzip, welches an einen festen Träger gebunden ist, in Kontakt bringt,
- 15 (iii) das an den festen Träger gebundene bindende Prinzip von der Probe trennt, und
- (iv) den gegebenenfalls an das bindende Prinzip gebundene, aus der Probe stammende BSE-Erreger (PrPsc) nachweist, wobei
- (v) das bindende Prinzip (ii) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: ein
- 20 Glykosaminoglycan, Fibronectin oder Lipoprotein A.

gelingt es auf nicht ohne weiteres vorhersehbare Weise ein Verfahren zum Nachweis von BSE-Erregern in einer Probe zur Verfügung zu stellen, welches diesen Nachweis auf einfache Art und Weise ermöglicht. Dabei weist dieses Verfahren die oben genannten Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf. Insbesondere ist es

- einfach und schnell in der Handhabung und

- sicher und kostengünstig in der Durchführung,

und es kann

- an Proben, die aus lebenden Organismen stammen, wie Blutproben, Gewebeproben oder Körperflüssigkeiten wie Urin, Milch, Liquor oder Speichel

5 bzw.

- an Boden- oder Pflanzenproben durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß werden BSE-Erreger nachgewiesen. Hierunter wird die pathologische Form des Prion-Proteins (PrP<sup>sc</sup>) verstanden.

10 Zum Abbau des nicht-pathologischen Prion-Proteins (PrP<sup>c</sup>) wird die Probe mit Proteinase K versetzt. Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, daß Proteinase K die nicht-pathologische Form hydrolytisch spaltet, die pathologische Form des Prion-Proteins aber nur zu einem geringen Teil. In Anbetracht der vorliegenden Erfindung ist es für den Fachmann jedoch klar, daß auch andere Proteasen, die vorgenanntem Zweck genügen, erfindungsgemäß eingesetzt werden können, ohne  
15 daß der Umfang der vorliegenden Erfindung verlassen wird. Die Verfahren zur hydrolytischen Spaltung mit Hilfe der Proteinase K sind dem Fachmann gut bekannt. Insbesondere gibt es eine Reihe von Arbeitsvorschriften in Laborhandbüchern, in denen die verwendbaren Puffersysteme, die anzusetzenden Inkubationszeiten sowie weitere einzuhaltende Reaktionsbedingungen ausführlich  
20 beschrieben sind.

Der hydrolytische Abbau des nicht-pathologischen Prionproteins mit Proteinase K wird beispielsweise in M. Schmerr et al., Journal of Chromatography A, 853 (1999) 207-214 beschrieben.

25 Beispielsweise können die PrP<sup>c</sup> abgebaut werden, indem eine Probe einem 30minütigen Abbau durch Proteinase K in einer 250 µg/ml Proteinase K-Lösung in einem üblichen Tris/EDTA-Puffer, pH 7,4, 37°C unterzogen werden.

Die nicht hydrolytisch gespaltenen Prion-Proteine, die erfindungsgemäß die pathologische Form PrP<sup>sc</sup> darstellen, werden mittels eines bindenden Prinzips aus der Probe entfernt. Dieses bindende Prinzip ist vorzugsweise ein

Glykosaminoglycan, besonders bevorzugt Pentosan Polyphosphat. Weitere bevorzugte, erfindungsgemäß einsetzbare Glykosaminoglycane sind Heparansulfat, Heparin, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratonsulfat oder Kongorot. Ebenso erfindungsgemäß bevorzugt einsetzbar ist  
5 ein künstlich hergestelltes sulfatiertes Glycosaminoglycan. Weiterhin bevorzugt ist Fibronectin als bindendes Prinzip einsetzbar. Weiterhin bevorzugt ist Lipoprotein A als bindendes Prinzip einsetzbar.

Dieses bindende Prinzip wird erfindungsgemäß an einen festen Träger gebunden.

Als feste Träger kommen hier bevorzugt alle festen Trägermittel in Betracht, die  
10 dem Fachmann auf dem Gebiet der Affinitätschromatographie bekannt sind. Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß sogenannte Beads verwendet, d. h. meist kugelförmige Microcarrier aus unterschiedlichen Materialien.

Weitere feste Träger, die erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden können, sind solche Säulenmaterialien, die bereits in der Affinitätschromatographie weite  
15 Verbreitung gefunden haben.

Weiterhin bevorzugt erfindungsgemäß einsetzbar sind mit dem oben beschriebenen bindenden Prinzip beschichtete Mikrotiterplatten.

Besonders bevorzugt sind auch Europium (Eu) enthaltende Nanobeads der Firma Seradyn, Indianapolis, USA. Diese Partikel sind mit Europium-Chelaten  
20 "aufgesaugt", so dass die Oberfläche frei für Kopplungsreaktionen bleibt und die Europium-Chelate nicht auslaufen. Europium-Chelat: tris-(naphtyltrifluorobutandion)-Eu. Wenn diese Partikel mit UV-Licht (333 nm Maximum) erregt werden, emittieren sie eine Lichtausstrahlung bei 613 nm mit einer Zeitdauer von ungefähr 0,5 Millisekunden, was 10 000fach bis 100 000fach  
25 länger als die Emissionsdauer der meisten Fluorophore ist. Diese extrem lange Emissionsdauer und die große Stokes-Verschiebung (Differenz zwischen Emissions- und Erregungswellenlänge) erlaubt ihre Verwendung in den auf zeitverzögerter Fluoreszenz basierten Tests. Jedes Partikel enthält >30 000 Europium-Atome, eingeschlossen in tris-Naphtyltrifluorobutandion (ein -  
30 Diketon). Für die 100 nm großen Partikel ist der s.g. Quantumertrag (quantum

yield, engl.) equivalent zu circa 3 000 Molekülen Fluorescein (einer der meist verwendeten Fluorophore). Das Phycobiliprotein (wahrscheinlich die am stärksten fluoreszierende bekannte Verbindung) hat zum Vergleich einen Quantumgewinn, der dem von ca. 30 Fluorescein Molekülen entspricht. Da ein 100 nm Partikel  
5 einen 10 mal größeren Durchmesser im Vergleich zu dem Phycobiliprotein und ein 1 000 mal größeres Volumenmasse Verhältnis hat, weisen diese Beads eine 100 mal höhere Fluoreszenz auf molarer Basis auf, als das Phycobiliprotein.

Die Nanopartikel werden zuerst bestrahlt (s.g. Erregungswellenlänge- bei Europium 340 nm) und nach einer Verzögerung von 400  $\mu$ s (in diesem Fall)  
10 werden die Signale 400  $\mu$ s lang gemessen. Durch diese Verzögerung wird die Registrierung von unspezifischen kurzdauernden Signalen aus der Matrix vermieden. Die Ergebnisse werden in RFU (relative fluorescence units) dargestellt. Die Messung läuft automatisch mit einem standardisiertem Fluorimeter, mit dem die zeitverzögerte Fluoreszenz gemessen werden kann.

15 Mithilfe des erfindungsgemäßen Testsystems werden Untersuchungen an Proben, die aus lebenden Organismen stammen, wie Blutproben, Gewebeproben oder Körperflüssigkeiten wie Urin, Milch, Liquor oder Speichel erfolgreich auf die Anwesenheit von BSE-Erregern (PrPsc; pathologische Form des Prion-Proteins) durchgeführt.

20 Ebenfalls können Untersuchungen an Boden- oder Pflanzenproben durchgeführt werden.

Besonders bevorzugt wird lysiertes thrombisches Ausgangsmaterial als Probe eingesetzt. Hierfür wird eine Blutprobe zur Gerinnung gebracht, und das entstehende thrombische Material abgetrennt. Das thrombische Material wird  
25 durch Hydrolyse mit einer Proteinase abgebaut, und die resultierende Probe direkt im Test eingesetzt.

Der an das bindende Prinzip gebundene BSE-Erreger wird bevorzugt über spezifische Antikörpertests nachgewiesen. Auch diese Tests und Nachweisverfahren sind dem Fachmann gut bekannt. Beispielhaft genannt werden



hier ELISA-, und RIA-Verfahren sowie Agglutinationstests und die Durchflusszytometrie.

- Prinzipiell sind hier alle Verfahren einsetzbar, die den Nachweis über einen spezifischen Erst-Antikörper, gegebenenfalls unter Verwendung eines für den
- 5 Erstantikörper spezifischen Zweitantikörpers, erlauben. Verfahren, die ein Verstärkungssystem wie ein an den Erst- oder Zweitantikörper gekoppeltes Enzym aufweisen, sind dabei erfindungsgemäß besonders bevorzugt einsetzbar.

Spezifische Antikörper wurden bereits beschrieben und können u.a. von der Fa. Prionics AG, Universität Zürich, Schweiz, käuflich erworben werden.

- 10 Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugtes System für den Nachweis des an das bindende Prinzip gebundene PrPsc umfasst an Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10-100 nm kovalent gebundene Antikörper. Die Nanopartikel enthalten Europium. Mittels der zeitverzögerten Fluoreszenz lassen sich diese Partikel und damit indirekt die Antikörper bzw, die Bindung der Antikörper an
- 15 PrPsc oder an den Erstantikörper hochempfindlich nachweisen.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Antikörper des vorhergehenden Absatzes nicht kovalent, sondern über das dem Fachmann gut bekannte Biotin/Streptavidin-System, wobei bevorzugt die Antikörper biotinyliert vorliegen, an das Nanobead gebunden sind.

- 20 Ein weiteres bevorzugtes Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist es, daß für den Nachweis der Träger markiert vorliegt, insbesondere in Form einer Eu-Markierung (EU-Nanobeads), und nach Abreicherung aus der Probe mittels Bindung an ein zweites bindendes Prinzip, insbesondere einen spezifischen anti-PrPsc-Antikörper die entsprechende Markierung durch entsprechenden Nachweis,
- 25 insbesondere die zeitverzögerte Fluoreszenz, nachgewiesen wird.

Es ist der vorliegenden Erfindung zu eigen, daß die einzelnen Bestandteile des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens dem Fachmann bekannt sind. Es war jedoch in keiner Weise vorherzusehen, daß eine Kombination dieser einzelnen Schritte zu einem Verfahren führt, daß in so überaus überraschend günstiger

Weise für ein solchermaßen intensives Bedürfnis der Fachwelt eine einfache Lösung bietet.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher. Sie sollen jedoch keineswegs limitierend verstanden werden.

5

#### BEISPIEL 1

##### Bindung von Pentosan an Microcarrier

Als Träger wurde Toyopearl HW55 (kommerziell erhältliches kreuzvernetztes Polyacrylat-Gel der Toyo Soda Manufacturing Co. Ltd., mit einer Partikelgröße  
10 von 50-100  $\mu\text{m}$ ) verwendet.

In 10 ml des Gels wurden 6 ml einer gesättigten wässrigen NaOH-Lösung und 15 ml Epichlorhydrin gegeben, und das Reaktionsgemisch wurde bei 50°C zwei Stunden unter Rühren inkubiert. Das Gel wurde aufeinanderfolgend mit Alkohol und Wasser gewaschen, um Epoxy-Gruppen in das Gel einzuführen. Zu dem  
15 resultierenden Epoxy-aktivierten Gel wurden 20 ml konzentriertes wässriges Ammoniak zugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 50°C gerührt, um in das Gel Amino-Gruppen einzuführen.

3 ml des so erhaltenen aktivierten Gels, welches Amino-Gruppen enthielt, wurde zu 10 ml einer 200 mg Pentosan Polysulfat enthaltenden wässrigen Lösung (pH  
20 4,5), hinzugefügt. Zu dem resultierenden Reaktionsgemisch wurden 200 mg 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid hinzugefügt, wobei der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf 4,5 eingestellt wurde, und das resultierende Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei 4°C geschüttelt. Nach Vervollständigung der Reaktion wurde das resultierende Reaktionsgemisch aufeinanderfolgend mit  
25 einer 2 M wässrigen NaCl Lösung, einer 0,5 M wässrigen NaCl Lösung und Wasser gewaschen, wodurch das gewünschte Gel erhalten wurde, auf dem Pentosan Polyphosphat immobilisiert war.

## BEISPIEL 2

Prionenhaltige Testproben werden nach üblichen Methoden mit Proteinase K zur Elimination der normalen Prionproteine PrPc behandelt.

- 5 Dazu wird die Probe auf eine Konzentration von 50 µg/ml Proteinase K (Boehringer) eingestellt, und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die näheren Bedingungen dieses enzymatischen Abbaus sind bei Schmerr et al., supra, beschrieben.

Beispielsweise kann folgendes Protokoll verwendet werden:

- 10 50 µl 1 mg/ml Proteinase K (Sigma, Kat.Nr. 82456) werden in 1 ml Probe pipettiert.

30 Min bei 37°C wird inkubiert.

100 µl 4 mM Pefabloc SC PLUS (Roche; Kat.Nr. 1 873 601) werden zugegeben.

Dann wird 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert.

- 15 Der Überstand wird mit Pentosan Polyphosphat beschichteten Beads aus Beispiel 1 versetzt. Es hat sich hier gezeigt, daß die Anwesenheit von 1mM Zink die Bindung fördert.

Die Beads werden durch Zentrifugation in einer Hettich-Tischzentrifuge sedimentiert und von der Testprobe getrennt.

- 20 Anschliessend werden die Beads mit spezifischen Antikörpern gegen Prionen (Prionics AG, Universität Zürich, 8057 Zürich, Schweiz) inkubiert und im ELISA mit Hilfe eines sekundären Antikörpers getestet. Ein positiver Testansatz ist gekennzeichnet durch vermehrte Anlagerung des sekundären Antikörpers an den Ligandenkomplex, die wiederum über die Umsetzung eines farblosen Substrates durch das an den Zweitantikörper gebundene Enzym gemessen werden kann.
- 25 Im Blut infizierter Tiere konnte der BSE-Erreger so auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

### BEISPIEL 3

Statt eines Elisa-Tests wurde ein Agglutinationstest durchgeführt.

Auch auf diese Weise konnte das BSE-Erreger auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

5

### BEISPIEL 4

Statt eines Elisa-Tests wurden die mit Zweitantikörper markierten Beads mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Auch auf diese Weise konnte das BSE-Erreger auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

10

Diese Vorgehensweise zum Nachweis von Prionen ist völlig neu und praktikabel. Mit dieser Methode können Blutproben, Gewebeproben, Körperflüssigkeiten (z. B. Urin, Milch, Liquor, Speichel, etc.) tierischer, menschlicher und pflanzlicher Herkunft getestet werden. Auch Bodenproben können auf eine Kontamination

15

### BEISPIEL 5

Zur kovalenten Bindung von Antikörpern an Nanobeads (FluoroMax™ Fluorescent microparticles, Seradyn, Indianapolis, USA) werden diese mit Carbodiimid und Hydroxysuccinimid behandelt, um eine sichere und feste Bindung zwischen den Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche und den Proteinmolekülen (Antikörpern) zu gewährleisten. So bleiben die Antikörper mit den Nanopartikel stabil gebunden (längere Haltbarkeit des Konjugats). Die Antikörper lassen sich nicht von den Beads bei den nachfolgenden Behandlungen (verschiedene Reaktionspuffer) trennen.

20

25

### BEISPIEL 6

Nachweis der Bindung des PrPsc an Pentosanpolyphosphat mittels Antikörper-Europium-Nanobead-Komplexe.

Die Europium-Nanopartikel wurden von der Firma Seradyn, Indianapolis, USA bezogen. Diese Partikel sind mit Europium-Chelate "aufgesaugt", so dass die  
5 Oberfläche frei für Kopplungsreaktionen bleibt und die Europium-Chelate nicht auslaufen. Europium-Chelat: tris-(naphtyltrifluorobutandion)-Eu. Wenn diese Partikel mit UV-Licht (333 nm Maximum) erregt werden, emittieren sie eine Lichtausstrahlung bei 613 nm mit einer Zeitdauer von ungefähr 0,5  
10 Millisekunden, was 10 000fach bis 100 000fach länger als die Emissionsdauer der meisten Fluorophore ist. Diese extrem lange Emissionsdauer und die große Stokes-Verschiebung (Differenz zwischen Emissions- und Erregungswellenlänge) erlaubt ihre Verwendung in den auf zeitverzögerter Fluoreszenz basierten Tests. Jedes Partikel enthält >30 000 Europium-Atome, eingeschlossen in tris-Naphtyltrifluorobutandion (ein -Diketon). Für die 100 nm großen Partikel ist der  
15 s.g. Quantumertrag (quantum yield, engl.) equivalent zu circa 3 000 Molekülen Fluorescein (einer der meist verwendeten Fluorophore). Das Phycobiliprotein (wahrscheinlich die am stärksten fluoreszierende bekannte Verbindung) hat zum Vergleich einen Quantumgewinn, der dem von ca. 30 Fluorescein Molekülen entspricht. Da ein 100 nm Partikel einen 10 mal größeren Durchmesser im  
20 Vergleich zu dem Phycobiliprotein und ein 1 000 mal größeres Volumen/Masse Verhältnis hat, weisen diese Beads eine 100 mal höhere Fluoreszenz auf molarer Basis auf, als das Phycobiliprotein.

Die Nanopartikel werden zuerst bestrahlt (s.g. Erregungswellenlänge- bei Europium 340 nm) und nach einer Verzögerung von 400  $\mu$ s (in diesem Fall)  
25 werden die Signale 400  $\mu$ s lang gemessen. Durch diese Verzögerung wird die Registrierung von unspezifischen kurzdauernden Signalen aus der Matrix vermieden. Die Ergebnisse werden in RFU (relative fluorescence units) dargestellt. Die Messung läuft automatisch mit einem standardisiertem Fluorimeter, mit dem die zeitverzögerte Fluoreszenz gemessen werden kann.

Beschrieben ist dieses System u.a. bei Ci, Y., *et al.*, J. Immun. Meth., 179, 233-241, 1995 sowie Souka *et al.* Clin. Chem., 47:3, 561-568.

- Für ähnliche Systeme (Eu-Nanobeads-Konjugate) werden Detektionsgrenzen für Prostata-spezifische-Antigene von  $7,3 \times 10^5$  Molekülen/ml berichtet (für
- 5 Prionprotein würde das ca. 36,3 fg entsprechen). Die bisher beschriebenen Zeit Nachweismethoden können 50 pg Prionprotein detektieren (Barnard, G. *et al.*, Luminescence, 15:6, 357-362, 2000)

#### BEISPIEL 7

- 10 Antikörperkoppelung an Träger mit dem Biotin/Streptavidin-System

- Biotin wird in den so genannten Zweischnitt-Techniken im Zusammenhang mit konjugiertem oder immobilisiertem Strept(Avidin) verwendet. Die Bindung des Biotins an das Strept(Avidin) ist sehr schnell und stabil. Es sind verschiedene Techniken zum Biotinylieren von Antikörpern beschrieben. Außerdem gibt es
- 15 auch Kits von mehreren Firmen mit dem entsprechenden Protokoll. Normalerweise wird das Biotin durch die Primäramine der Proteine (z.B. Lysin) konjugiert und so werden 3 bis 6 Moleküle Biotin pro Protein-Molekül gebunden. Beispielsweise kann das Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) verwendet werden. Die Trennung des nicht konjugierten Biotins vom Antikörper kann mit
- 20 Zentrifugenmikrokonzentratoren Nanosep™ (Pall) durchgeführt werden. Die Stufe des Biotinilierens wird durch die s.g. HABA-Reaktion (HABA-2-(4'hydroxyazobenzene)-benzoic acid) mit Überschuß von Avidin photometrisch bestimmt.

- Die Beschichtung der Nanopartikel mit Streptavidin wird nach Härmä *et al.*, Clin.
- 25 Chem., 47:3; 561-568 (2001) durchgeführt. Nach Vorwaschen der Beads mit PBS, pH 7,0 mit Nanosep™ Zentrifugenmikrokonzentratoren, werden diese in demselben Puffer mit Ultraschallsonde resuspendiert. Danach erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppen mit 10 mM N-(3 -dimethylaminopropyl)-N' - ethylcarbodiimide (EDAC), (Pierce) und N-hydroxysulfosuccinimide (NHS),

(Sigma) für 30 Minuten. Nach zwei Waschprozeduren (wie oben, aber mit Carbonatpuffer pH 9,0) wird 15 µM Streptavidin zugegeben und die Beads für 1 Stunde inkubiert. Am Ende werden die Nanopartikel 5 mal mit 2 mM Tris-HCl (Sigma), pH 7,0 gewaschen und bei 4°C gelagert.

5

#### BEISPIEL 8:

Bindung von PrPSc an Europium-Nanobeads über Fibronectin (s. Beispiel 7)

Es hat sich hier gezeigt, daß es insbesondere wichtig ist, eine Methode zu verwenden, bei der die Konformation der Fibronectin-Moleküle am geringsten beeinflusst wird.

10

Das Abtrennen der (Nano-)Beads von der Probe kann durch Zentrifugation und/oder durch Verwendung sogenannter Zentrifugenkonzentratoren (Mikrofilter) erfolgen. Je nach Bindungsstärke zwischen Fibronectin und PrPSc können die Beads- PrPSc-Komplexe gewaschen werden, um möglichst höchste Trennung der beiden PrP-Formen zu bekommen.

15

#### Das prinzipielle Vorgehen war wie folgt:

1. Fibronectin wird mit Nanobeads (Europium-Nanobeads) gekoppelt.
2. Die Probe wird mit Fibronectin-Nanobeads inkubiert. Die pathologische Form des PrP (PrPSc) haftet an dem Fibronectin und die normale Form (PrPC) nicht-bleibt in dem Reaktionsgemisch aufgelöst.
3. Nachher werden die Fibronectin-Nanobeads durch Abzentrifugieren von der Probe getrennt und in einem Reaktionspuffer resuspendiert.
4. Die resuspendierten Fibronectin-Nanobeads werden auf einer mit monoklonalen Antikörper (gegen PrP) beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert (Bildung des Komplexes MoAk-PrPSc-Fibronectin-Nanobeads).
5. Nach dem Waschvorgang wird die Fluoreszenz gemessen (zeitaufgelöst) und die Konzentration von PrPSc bestimmt.

20

25

Eine detaillierte Anweisung folgt:

- Human FN (FIBRONECTIN- Lot: 000832, Firma: BD Biosciences. MG: 440 kDa) oder andere Fibronectinrekombinante.
- 1 mg/ml FN: Eine Flasche 1 mg FN wird zu RT gebracht und wird mit 1 ml  
5 sterilem dest. H<sub>2</sub>O für 30 Min aufgelöst.
- 0,5 ml 1% MP (Seradyn, FLUORO-MAX FLUORESCENT PARTICLES PartNr. 1347-0350) mit 0,5 ml 50 mM pH 6,1 MES (Morpholinoethansulfonsäure, Sigma- ProduktNr. M8250) und Nanosep 300kDa cut-off (Pall Life Sciences; ProduktNr. OD300C33) 5 min bei 14 000g  
10 2x waschen.
- Nach dem letzten Waschvorgang in 0,5 ml 50 mM pH 6,1 MES resuspendieren, in 2,0 ml Eppendorfröhrchen überführen und bis 1,0 ml mit 50 mM pH 6,1 MES zufüllen.

Voraktivierung:

- 15 a) EDAC (Carbodiimid- Fa. Pierce, Kat.Nr. 22980): 0,6 molarer Überschuß:  
0,5 ml 1% MP= 5 MP; MP acid content meq/g =  $\mu\text{mol/mg}$ ;
- b) (acid content,  $\mu\text{mol/mg}$ ) (5 mg MP) (gewünschtes Verhältnis) =  $\mu\text{mol}$   
EDAC benötigt:  $0,1566 \times 5 \times 0,6 = 0,4698 \mu\text{mol}$  EDAC benötigt
- c) ( $\mu\text{mol}$  EDAC benötigt) / ( $52 \mu\text{mol/ml}$ ) = ml EDAC Stammlösung pro ml  
20 Reaktion:  $0,4698/52 = 0,009 \text{ ml}$  EDAC Stammlösung
- d) EDAC Stammlösung: 10 mg/ml in dest. Wasser, unmittelbar vor der Verwendung anfertigen.
- e) In folgender Reihe zu den gewaschenen MP pipettieren:
- 230  $\mu\text{l}$  NHS Stammlösung (50 mg/ml in dest. Wasser N-hydroxysuccinimid-  
25 Sigma, Kat.Nr. H7377)
- 9  $\mu\text{l}$  EDAC Stammlösung
- Bei RT (Raumtemperatur) 30 Minuten bei ständigem Mischen inkubieren.



- Die MP 2x waschen mit 50 mM pH 6,1 MES und Nanosep wie in 3.
- Nach dem letzten Waschvorgang LWV in 0,5 ml 100 mM pH 6,1 MES resuspendieren und in 2,0 ml Eppendorf überführen.
- 0,5 ml FN-Lösung von 2. zugeben, gut mischen.
- 5 • 2 St bei RT bei ständigem mischen inkubieren.
- MP 2x mit 50 mM pH 6,1 MES und Nanosep waschen wie in 3.
- Nach dem LWV in 0,5 ml MNTA (25 mM MOPSO Sigma Kat.Nr.M8389, pH 7,4; 100 mM NaCl-Sigma, Kat. Nr. 71378; 0,1% Tween20 Sigma, Kat.Nr 27,434-8; 0,1% NaN<sub>3</sub> Sigma Kat.Nr. 71290) resuspendieren.
- 10 • Bei 4°C aufbewahren.

#### Beschichten der Mikrotiterplatte:

- Platte (Nunc, Fluoro-Nunc Modules F16 Maxi-Sorp, Kat.Nr. 47515) coaten:
- 6H4 (Monoklonaler Antikörper, Prionics): 8 µg/ml, 96 wells –in Bic/Carb Puffer pH 9,4 (Pierce, Kat.Nr. 28382) verdünnen, 50 µl/well pipettieren.
- 15 • 3 Stunden bei 37°C inkubieren.

#### Blockieren unspezifischer Bindestellen:

- 1x200 µl mit Waschpuffer (5 mM Trizma pH 7,8 Sigma Kat.Nr. 93349; 150 mM NaCl; 0,05% Tween20) waschen.
- 100 µl Blocking Puffer(50 mM Trizma pH 7,8 Sigma Kat.Nr. 93349; 150 mM NaCl; 2% Rinder Serumalbumin, Immucore Kat.Nr. 004410; 2 Gelatine Sigma Kat.Nr. G7765; 0,05% Tween20; 0,05% NaN<sub>3</sub> ) je Kavität pipettieren.
- 20 • 1 Stunde bei Raumtemperatur schütteln –450 rpm.
- Absaugen des Überstandes.

#### Antigen-MP-FN Inkubation:

- 25 • Die MP-FN 1: 742 in PBS-Tween20 2% ( PBS Pierce Kat.Nr. 28374; Tween20 2%) verdünnen.

- In Eppendorfröhrchen 50 µl Proteinase K behandelte Probe und 50 µl verdünnte MP-FN pipettieren und 2 St bei RT bei ständigem Mischen inkubieren.
- 2 Min bei 14 000g mit Nanosep zentrifugieren.
- 5 • Filtrat verwerfen und die MP-FN in 100 µl PBS-Tween20 2% resuspendieren.
- 30 µl je Probe exakt auf Kavitätenboden.
- 2 Stunden bei 37°C bei 450 rpm inkubieren.
- 2x300 µl PBS-Tween20 2% waschen.

Messen (zeitverzögerte Fluoreszenz):

- 10 • Gerät: Tecan GENios, Program XFluor4: 10 Blitze, Verzögerung 400 µs, Integration: 400 µs.

BEISPIEL 9

Fibronectin wird mit Beads (Polystyrenbeads) gekoppelt:

- 15 Proteinase K behandelte und unbehandelte Proben werden mit Fibronectin-Nanobeads inkubiert

Dann wird die Probe mit den Fibronectin-Beads inkubiert.

Nachher werden die Fibronectin-Beads gewaschen und in einem Reaktionspuffer resuspendiert.

- 20 Die resuspendierten Beads werden mit einem monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörper (gegen PrP) inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Fluoreszenzsignale in einem Durchflußzytometer gemessen.

- 25 BEISPIEL 10:

Bindung von PrPSc in mit Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatten.

1. Die Mikrotiterplatte wird mit Fibronectin beschichtet (gecoatet).
2. Die Probe wird in der Mikrotiterplatte inkubiert. Die pathologische Form des PrP (PrPSc) haftet an dem Fibronectin und die normale Form (PrPC) nicht-  
5 bleibt in dem Reaktionsgemisch aufgelöst.
3. Nach dem Waschvorgang werden die mit monoklonalen Antikörper (gegen PrP) gekoppelten Europium-Nanobeads in die Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert.
4. Nach dem Waschvorgang wird die Fluoreszenz gemessen (zeitaufgelöst) und  
10 die Konzentration von PrPSc bestimmt.

Ein detailliertes Verfahren lautet beispielsweise wie folgt:

Platte (Nunc, Fluoro-Nunc Modules F16 Maxi-Sorp, Kat.Nr. 47515) coaten:

- FN 2,5 µg/ml in PBS (Pierce, Kat.Nr. 28374) pH 7,2 verdünnen, 50 µl/well pipettieren.
- 15 • 1 St bei RT inkubieren.
- Absaugen.
- Platte vorsichtig mit dest. Wasser 3x 300 µl waschen.

Antigen Inkubation:

- 30 µl Proteinase K behandelte Probe in die Kavitäten pipettieren.
- 20 • 1,5 St bei RT- 450 rpm inkubieren.

MP-3F4 Inkubation:

- 1x200 µl PBS-Tween20 2% waschen.
- Die MP 1:296 in PBS-Tween20 2% verdünnen.
- Die Verdünnung gut mischen.
- 25 • 30 µl genau auf Kavitätenboden pipettieren.

- 4 St bei bei 30°C inkubieren- 450 rpm schütteln.
- 2x200 µl mit PBS-Tween20 2% waschen.

Messen:

- Gerät: Tecan GENios, Program XFluor4: 10 Blitze, Verzögerung 400 µs,  
5 Integration: 400 µs.

BEISPIEL 11:

Bindung von PrPSc an Europium-Nanopartikel über Lipoprotein A.

Vorgehensweise s. Beispiel 9 (anstelle von Fibronectin wurde Lipoprotein A  
10 eingesetzt. Es kann auch Apolipoprotein A eingesetzt werden.).

BEISPIEL 12:

Bindung von PrPSc an mit Lipoprotein A beschichteten Polystyrenbeads.

Vorgehensweise s. Beispiel 10 (anstelle von Fibronectin wurde Lipoprotein A  
15 eingesetzt. Es kann auch Apolipoprotein A eingesetzt werden.).

BEISPIEL 13:

Bindung von PrPSc in mit Lipoprotein A beschichteten Mikrotiterplatten.

Vorgehensweise s. Beispiel 11 (anstelle von Fibronectin wurde Lipoprotein A  
20 eingesetzt. Es kann auch Apolipoprotein A eingesetzt werden.).

## Patentansprüche:

1. *In Vitro*-Verfahren zum Nachweis von BSE-Erregern (PrPsc) in einer Probe, wobei
  - 5 a) die Probe mit Proteinase K behandelt wird,
  - b) die so behandelte Probe mit einem PrPsc-bindenden Prinzip, welches an einen festen Träger gebunden ist, in Kontakt gebracht wird,
  - c) das an den festen Träger gebundene bindende Prinzip von der Probe getrennt wird, und der gegebenenfalls an das bindende Prinzip gebundene, aus der Probe
    - 10 stammende BSE-Erreger (PrPsc) nachgewiesen wird, dadurch gekennzeichnet,
    - d) daß das bindende Prinzip ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: ein Glykosaminoglycan, Fibronectin oder Lipoprotein A.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei für den Nachweis (c) ein PrPsc-spezifischer monoklonaler Antikörpertest verwendet wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei für den Nachweis (c) der Träger aus Stufe (b) markiert vorliegt, und nach Abreicherung aus der Probe mittels Bindung an ein zweites bindendes Prinzip die entsprechende Markierung durch entsprechenden Nachweis nachgewiesen wird.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das
  - 20 Glykosaminoglycan Heparansulfat, Heparin, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat, Keratonsulfat oder Kongorot ist.
  5. Verfahren nach Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das bindende Prinzip ein künstlich hergestelltes sulfatiertes Glycosaminoglycan ist.
  6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 1, wobei die Probe aus dem
    - 25 menschlichen oder tierischen Körper oder aus Pflanzen stammt.
    7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Probe eine Blutprobe, Gewebeprobe oder eine Körperflüssigkeit wie Urin, Milch, Liquor oder Speichel ist.

8. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Probe lysiertes thrombisches Material ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Probe eine Bodenprobe ist.
- 5 10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als fester Träger ein Microcarrier (Bead) verwendet wird
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß der für den Nachweis verwendete Antikörper an ein Nanobead mit einem Durchmesser von 10-100 nm gekoppelt ist, welches Europium enthält, und  
10 wobei der gegebenenfalls an das bindende Prinzip gebundene, aus der Probe stammende BSE-Erreger (PrPsc) mit Hilfe der zeitverzögerten Floureszens nachgewiesen wird.
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß die Bindung des PrPsc an das bindende Prinzip nachgewiesen wird über  
15 zeitverzögerte Floureszens von an das bindende Prinzip gebundenen, Europium enthaltenden Nanobeads.
13. Verfahren nach einem der vorstehend genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als fester Träger Mikrotiterplatten verwendet werden.
14. Verfahren nach einem der vorstehend genannten Ansprüche, dadurch  
20 gekennzeichnet, daß als fester Träger eine Fritte verwendet wird.
15. Diagnostisches System in Form eines Kits zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von BSE-Erregern (PrPsc) nach einem der vorstehenden Ansprüche, mindestens umfassend das an einen festen Träger gebundene bindende Prinzip.
- 25 16. Diagnostisches System nach Anspruch 13 weiterhin umfassend eine Proteinase, bevorzugt Proteinase K.
17. Diagnostisches System nach Anspruch 13 oder Anspruch 14 weiterhin umfassend einen spezifischen Antikörper gegen PrPsc sowie gegebenenfalls eine gegen den spezifischen Antikörper gerichteten Zweitantikörper.